Über eine elektronische Methode zur Zählung niedriger Thrombozytenwerte im peripheren Blut

Hans-Jürgen Koschinski

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0033

Aus dem
Lehrstuhl für Innere Medizin (Hämatologie) der Universität
und
dem Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Assoziation mit EURATOM, München
(Vorstand: Prof.Dr.W.Stich)

ÜBER EINE ELEKTRONISCHE METHODE ZUR ZÄHLUNG NIEDRIGER THROMBOZYTENWERTE IM PERIPHEREN BLUT.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Jürgen KOSCHINSKI
aus München

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Walter Stich

Dekan: Prof. Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.Oktober 1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet.

I N H A L T

A. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

B. MATERIAL UND METHODIK

I. Material

a) Coulter Partikelzählgerät

b) Suspensionsmedium

c) Sonstiges Gerät

d) Faraday'scher Käfig

II. Methodik

1) Untersuchungsvorgang

a) Probenaufbereitung

b) Meßvorgang

c) Errechnung der Thrombozytenkonzentration

2) Überprüfung der angegebenen Methode

a) Krankengut

b) Versuchsanordnungen

c) Gesichtspunkte und Methoden zur Auswertung der Meßdaten

C. ERGEBNISSE

I. Elektrische Abschirmung des Coulter-Meßgerätes

II. Versuchs- und Auswertungsergebnisse

1) Gegenüberstellung Coultermessungen-Kammerzählungen

2) aa) Abweichung der Einzelproben jeder Versuchsreihe

bb) Abweichung beim mehrfachen Messen einer Probe

3) Die zeitliche Haltbarkeit der Proben

4) Prüfung EDTA-beschichteter Röhrchen

D. BESPRECHUNG

1) Voraussetzungen für die eigene Methodik
2) Entwicklung der eigenen Methodik
3) Elektrische Abschirmung des Gerätes
4) Visuelle Methoden - eigene Methodik
5) Andere automatische Methoden - eigene Methodik
6) Genaue Handhabung der angegebenen Methodik
   a) Sauberkeitsanforderungen
   b) Probenherstellung
   c) Eichung des Gerätes und Meßvorgang
   d) Bauanleitung für den Faraday'schen Käfig

E. ZUSAMMENFASSUNG

F. ABBILDUNGEN

I. Hergang der Probenaufbereitung
II. Eichkurve

G. LITERATURVERZEICHNIS

H. KOINZIDENZ - KORREKTURKARTE

A. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Ein Teil der Erkrankungen aus dem Formenkreise der hämorrhagischen Diathesen wird durch Thrombopenien verursacht. Dabei kann die Unterzahl der Blutplättchen einmal durch eigene, isolierte Krankheiten hervorgerufen werden oder aber durch andere Grundkrankheiten bedingt, symptomatisch auftreten. Für Diagnostik und Therapiekontrolle wird es stets von Bedeutung sein, die Thrombozytenkonzentration im Blute feststellen zu können.
Die Methoden, die zur Thrombozytenbestimmung benutzt werden, kann man heute zweckmäßig in mikroskopisch-visuelle und elektronische Zählverfahren unterteilen.
Nach einer ausführlichen Zusammenstellung von ROMEIS (23) gehört dabei zu den visuellen Methoden zunächst die indirekte Thrombozytenbestimmung nach Fonio: das Verhältnis der Thrombozytenzahl zur Erythrozytenzahl wird mikroskopisch in einem gefärbten Blutausstrich festgestellt; diese relative Zahl der Blutplättchen wird dann zur absoluten Erythrozytenzahl, die mit einer üblichen Kammerzählung ermittelt wird, in Beziehung gesetzt und die Thrombozytenkonzentration pro mm^3 Blut errechnet.
Eine andere, aber bereits direkte Thrombozytenbestimmung geht auf Brecher und Cronkite zurück. Benutzt wird dabei eine Zählkammer und das Phasenkontrastmikroskop mit Oelimmersion. Das Zählergebnis muß entsprechend Verdünnung, Zählnetzgröße und Tiefe mit einem Faktor 2.000 multipliziert werden, um die Thrombozytenzahl in 1 mm^3 Blut zu erhalten. Bei schweren Thrombopenien wird empfohlen, durch entsprechende Mehrauszählung von Netzquadraten, den Umrechnungsfaktor auf 250 zu senken.
Feissly und Ludin verwenden eine cocainhaltige Verdünnungslösung und können so eine direkte Thrombozytenzählung mit Normaloptik durchführen, da die Erythrozyten durch Hämolyse zurücktreten.
Marx und Derlath verbessern diese Methode durch Einführung von Novocain und Titriplex. Nach direkter Auszählung der Thrombozyten in einer Neubauer-Kammer wird auch hier eine Multiplikation des ermittelten Wertes mit einem Faktor 1.000 benötigt.
Von diesem Verfahren zur Thrombozytenzählung unterscheiden sich nun vollkommen jene Methoden, die entwickelt wurden, nachdem elektronische Partikelzählgeräte Eingang in das medizinische Laboratorium fanden. Hatte es dabei nahe gelegen zunächst Zählverfahren der größeren korpuskulären Elemente des Blutes,

der Erythrozyten und Leukozyten zu entwickeln, so versuchte man bald auch die Thrombozytenzählung, da doch KUBITSCHEK (16) schon Bakterien zählte, die etwa halb so groß wie die kleinsten Blutplättchen waren.
Grundsätzlich kann man feststellen, daß das entscheidende Problem bei der Thrombozytenbestimmung mit einem Partikelzählgerät in der vorherigen weitgehenden Abtrennung der Blutplättchen von den anderen geformten Blutelementen liegt. Zwei Wege können dazu beschritten werden: die Differentialzentrifugation oder aber die Sedimentation. Nicht möglich ist es dagegen bisher, sich der Hämolyse zu bedienen, da zurückbleibende Zelltrümmer die alleinige Zählung der Thrombozyten verhindern würden. Die Vorteile der Bestimmungen mit Partikelzählgeräten ergeben sich dadurch, daß der Zählvorgang automatisch elektronisch und damit ermüdungsfrei und sehr schnell abläuft. Wichtig ist es außerdem, daß die absolute Zahl der gezählten Partikel wesentlich höher liegen kann (kleiner Umrechnungsfaktor) als bei allen mikroskopischen Verfahren. Diese Möglichkeit vermindert den statistisch zu erwartenden Zählfehler erheblich.
Das Ziel dieser Arbeit war es nun, die in neuester Zeit an unserem Institut von BALLEISEN (1) ausgearbeitete Methode der Thrombozytenzählung mit einem Partikelcounter, die auf einer bestimmten Art der Differentialzentrifugation aufbaut, so zu modifizieren, daß auch bei pathologisch sehr stark erniedrigten Thrombozytenkonzentrationen gut reproduzierbare Zählungen durchgeführt werden können. Gerade in diesem Zählbereich werden die mit den üblichen visuell-mikroskopischen Methoden erreichbaren Ergebnisse unsicher und schwankend und lassen kaum mehr ein Urteil über einen geringgradigen Anstieg oder eine Abnahme der Thrombozytenkonzentration zu. Wie der Versuch zeigt, war aber auch die Methode von BALLEISEN (1) nicht geeignet, bei krassen Thrombopeniefällen reproduzierbare Werte zu liefern. Es konnte weiter festgestellt werden, daß die Autoren, die andere Methoden zur Thrombozytenzählung mit dem Partikelcounter veröffentlichen, kaum Angaben über Zählungen in diesem Extrembereich machen.
Vor Arbeitsbeginn mußte zunächst ein technisches Problem gelöst werden, das an dem bei uns verwendeten Coulter Counter Modell "F" auftrat. Dieses Gerät wurde durch starke äußere Interferenzstörungen aus unserem Institut selber (alle nur denkbaren elektrischen Apparate sind hier aufgestellt), besonders aber aus der Umgebung (das Institut befindet sich im Zentrum der Stadt München) stark gestört und erwies sich aus diesem Grunde als unbrauchbar für eine genaue Thrombozytenzählung.

Der hinzugezogene Mechaniker der Firma Coulter konnte dabei keine Abhilfe schaffen. Ähnliche, vielleicht nicht ganz so extreme Störungen dürften auch andererorts ein Problem bei der Thrombozytenzählung darstellen.
Geprüft werden sollte abschließend noch, ob die auf der "Analytica 72" (Ausstellung) gezeigten, mit einer EDTA-Beschichtung versehenen Kunststoffröhrchen bei unserer Thrombozytenbestimmung mit einem Partikelzählgerät verwendet werden können.

B. MATERIAL UND METHODIK

I. Material

a) Coulter Partikelzählgerät

Bei unseren Versuchen wurde das Modell "F" der Firma Coulter*) benutzt.

Auch dieses Gerät beruht auf dem bereits 1956 von Coulter herausgebrachten Konstruktionsprinzip, doch sind die Kontrollmöglichkeiten, die den Zählvorgang überwachbar machen, besser entwickelt worden. Die Zählung von Partikeln und damit auch von Blutkörperchen und Thrombozyten geschieht auf folgende Weise: die Partikel sind in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit aufgeschwemmt, von der mittels eines Vakuums, das von einem Quecksilbermanometer erzeugt wird, eine genau bestimmte Menge durch eine Mikrokapillare in ein inneres Glassystem eingesaugt wird. Die eingesaugte Menge der Suspension und die Größe der Mikrokapillare sind wählbar, in unserer Versuchsanordnung wurden stets 0,1 ml bei einer Kapillaröffnung von 70 Micron gemessen. Die Mikrokapillare befindet sich zwischen zwei Elektroden, einer äußeren und einer inneren und stellt die in einem Stromkreise liegende Meßzone dar, in der beim Durchtreten eines jeden Partikels ein Spannungsabfall (Partikel sind relative Nichtleiter) auftritt u.zw. von bestimmter Größe, die dem Volumen des Partikels direkt proportional ist. Die so entstehenden Impulse werden nach Verstärkung vom Gerät auf einem elektronisch-mechanischen Zählwerk registriert. Zur Kontrolle erscheinen sie auch auf dem eingebauten Bildschirm einer Kathodenstrahlröhre und geben dort in ihrer Ausschlagshöhe Anhalt über die Partikelgröße, in ihrer Reihenfolge aber auch über ordnungsgemäßen Durchtritt oder über Störungen des ganzen Systems, z.B. durch eingesaugte Luftblasen oder durch Interferenzeinflüsse. Der ordnungsgemäße Durchfluß des partikelangereicherten Elektrolyts ist ebenso auf einer Mattscheibe mit der Projektion der vergrößerten Kapillare zu verfolgen. Als dritte Kontrollmöglichkeit dient das akustische Signal, das pro 1.000 gezählte Partikel als Knacken ertönt und dessen Rythmus einen weiteren Hinweis auf den funktionsgerechten Durchtritt zuläßt.

*) Coulter Electronics Ltd.
High Street South
Dunstable, Bedfordshire
England

Deutsche Niederlassung:
Coulter Electronics GmbH.
4150 Krefeld
Hülserstraße 293

Die Impulsgröße, die ein Partikel hervorruft, ist direkt proportional zu seinem Volumen aber auch abhängig von der regulierbaren Stromgröße und der ebenfalls getrennt davon wählbaren Verstärkung. Am Gerät ist eine Schwellenwerteinstellung möglich, mit der bestimmt werden kann, von welcher Größe an die Impulse im Zählwerk festgehalten werden sollen. Ein Diskriminator fängt kleinere Impulse ab.
Da es möglich ist, daß auch zwei Partikel gleichzeitig durch die Kapillare treten können und nicht getrennt registriert werden, muß dieser Koinzidenz-Fehler durch Korrekturtafeln ausgeglichen werden, die für die benutzte Kapillargröße und die angesaugte Suspensionsmenge errechnet wurden.

b) Suspensionsmedium
Als Suspensionsmedium benutzten wir das von BALLEISEN (1) angegebene Gemisch aus ISOTON-PERISTON-Na_2-EDTA im Verhältnis 22 : 2 : 1. Hauptbestandteil ist demnach die 0,9%ige Elektrolytlösung "Isoton", die von der Firma Coulter Electronics mit der Gewähr für möglichste Partikelfreiheit vertrieben wird und einen antibakteriellen Zusatz von Na N_3 enthält. PERISTON-Bayer, mit dem noch zu besprechenden POLYVINYLPYRROLIDON - Bestandteil ist als Blutersatzmittel im Handel. Na_2 EDTA-Lösung (Titriplex III) wird in zweiprozentiger, sterilisierter Form zugesetzt.

c) Sonstiges Gerät
Die Blutabnahme erfolgt mit Kunststoff-Einmalspritzen. Für die Zentrifugation werden 20 ml Reagenzröhrchen aus Polystyrol (21,5/100 mm) der Firma Greiner*) benutzt. Um die Verdünnung herzustellen werden 0,1 ml Kapillaren (der Firma Dade) verwendet. Das Meßgefäß ist ein 20 ml Coulterglas mit Kunststoffdeckel. Vom Elektrolytgemisch wurde bei uns die benötigte Menge mit dem Diluter der Firma Coulter abgefüllt.
Zur Zentrifugation kann eine übliche Laborzentrifuge benutzt werden.

d) Der Faraday'sche Käfig
Für den Bau eines Faraday'schen Käfigs zur Abschirmung des Partikelzählgerätes (Erklärungen siehe später) wurde von uns Kupfer-Fliegendrahtgitter verwendet, das in Spezialgeschäften leicht erhältlich ist. Die Maschengröße des Gitters beträgt etwa 1 mm^2. Benötigt wird bei einer Rollenbreite von 80 cm eine Lagenlänge von 4,oo m.

*) Greiner und Söhne
7440 Nürtingen

II. Methodik

1) Untersuchungsvorgang

a) Probenaufbereitung

Nach Vorgabe von 1ml Titriplex III in einer Spritze wird 4 ml venöses Blut aufgezogen, sofort gut durchgemischt und das antikoagulierte Blut in eine Polystyrolröhre entleert. Hieraus wird mit einer 0,1 ml Kapillare Blut entnommen und in 20 ml ISOTON-PERISTON-EDTA-Gemisch eingebracht, das genau abgemessen in einer Polystyrolröhre bereitgehalten wurde. Damit ist in einem Schritt die endgültige Verdünnung der Meßlösung (1/200) hergestellt. Die verdünnte Blutprobe wird mit einem Kunststoffdeckel versehen und durch leichtes Schütteln gemischt. Die sich anschließende Zentrifugation erfolgt in Einsätzen, die nur 45° ausschwenken oder in einem entsprechenden Winkelaufsatz. Die Zentrifugationszeit beträgt 5 Minuten, gerechnet vom Erreichen der Tourenzahl bis zum Abstellen des Antriebmotors; es wird bei 85 g zentrifugiert. Sofort nach Auslaufen der Zentrifuge wird über das Zentrifugat hinweg, möglichst vollständig bis auf den letzten am Röhrchenrande hängenbleibenden Tropfen, in ein weiteres Polystyrolröhrchen dekantiert. Unter den gleichen, eben genannten Bedingungen wird nochmals zentrifugiert, dann aber in ein Coulterglas dekantiert. Die nun ausreichend erythrozytenarme Lösung kann -nach zwei bis dreimaligem vorsichtigen Umkippen- gemessen werden.
(Die genannten Vorgänge sind in Abb. I schematisch dargestellt).

b) Meßvorgang

Das Coulter-Gerät Modell "F" ist, wie schon erwähnt, mit einem Diskriminator ausgerüstet, der bei der Zählung alle Impulse abfängt, die kleiner sind als die durch Schwellenwerteinstellung festgesetzten Impulshöhen. Dagegen ist es bei diesem Partikelzählgerät nötig, die nach der Zentrifugation verbliebenen Erythrozyten mit einer zweiten Messung von den Thrombozyten abzugrenzen. Die Zweistufenmessung, die wir bei unserem Gerätetyp aus diesem Grunde anwenden müssen, wurde wohl von SIPE und CRONKITE (24) zuerst gebraucht und ist allgemein üblich geworden. Im Prinzip geschieht folgendes: eine Messung der Probe bei niedriger Schwelle erfaßt kleine und große Partikel(Thrombozyten, Erythrozyten und evtl. noch verbliebene Leukozyten); bei einer zweiten Messung mit höherer Schwelle werden nur noch große Partikel (Erythrozyten, Leukozyten) gezählt. Die Differenz zwischen beiden Meßwerten ergibt die Thrombozytenpopulation. Vor Beginn der Messungen

muß das jeweilige Gerät für die Thrombozytenzählung geeicht und eingestellt werden (Hinweise dazu siehe später). Bei unserem Gerät ergaben sich die Schwellenwerteinstellungen 6 und 70, bei einer Stromstärke (Aperture) von 8 und einer Verstärkung (Attenuation) von 0.500.
Da die von uns gewählte, Zusätze enthaltende Elektrolytlösung nicht ganz partikelfrei ist, muß dieser "background" bei den Messungen durch entsprechende Subtraktion berücksichtigt werden.
Bei unseren Versuchen und Messungen war es nötig, den Coulter Counter Modell "F" mit einem Faraday'schen Käfig gegen die störenden äußeren Interferenzeinflüsse abzuschirmen. Die Prüfungsmethode, ob eine derartige Abschirmung im einzelnen Falle nötig ist, wird im Kapitel "Elektrische Abschirmung des Coulter-Meßgerätes" erläutert.

c) Errechnung der Thrombozytenkonzentration
Nach der Messung einer Probe wird von dem Wert, der für die niedrige Schwelle ermittelt wurde, der "background" abgezogen und dieser Wert mit der Koinzidenztafel (siehe letzte Seite der Arbeit) korrigiert; vom Ergebnis wird sodann der ebenso behandelte zweite Wert (für die hohe Schwelle) abgezogen und das Resultat entsprechend der gewählten Verdünnung und gemessenen Menge mit 2 multipliziert. Berücksichtigt werden muß ferner der Spritzenfaktor (5/4), der durch Verdünnung des Blutes mit der Titriplexlösung entsteht. Diese Berechnung der Thrombozytenkonzentration des Blutes pro mm^3 läßt sich in der Formel zusammenfassen:

$$\text{Throm. Konz/mm}^3 = \Big[(\text{korr.Wert niedr.Schwelle}) - (\text{korr.Wert hohe Schwelle}) \Big] \times 10/4$$

2) Überprüfung der angegebenen Methode

Um die Brauchbarkeit der angegebenen Methode zur Bestimmung der Thrombozytenkonzentration von stark thrombopenischem Blut darzulegen, wurden Versuchsreihen mit Thrombopeniepatienten durchgeführt.

a) Krankengut

Patientin A geb. 24.4.1914 Hausfrau

Diagnose: chronische Lymphadenose mit Antikörpermangelsyndrom, Anämie und Thrombopenie

Ergebnis der Myelotomie: chronische Lymphadenose mit diffuser Markdurchsetzung und weitgehender Verdrängung des myeloischen Parenchyms, d.h. aller drei myeloischer Zellsysteme.

Laborbefunde z.Zt. der Untersuchung:

am 28.2.1972		am 6.3.1972	
BKS:	41/74	BKS:	27/68
Hb:	11,4 g %	Hb:	9,3 g %
Ery:	5,2 Mill.	Ery:	3,11 Mill.
Leuko:	164.500	Leuko:	125.000
Diff.Blutb.:	100 % Lymphoz.	Diff.Blutb.:	1% Segm./99% Lymphoz.
Thromboz.:	9.000 (Kammer)	Thromboz.:	22.000 (Kammer)

Patientin B geb. 26.4.1919 Med. techn. Assistentin

Diagnose: 1.) Medikamentös-allergische Knochenmarksathropie mit peripherer Panzytopenie. Nachweis von Pyrazolonantikörpern
2.) Gastrointestinale Blutung bei Thrombopenie
3.) Antikörpermangelsyndrom
4.) Pseudomonas-Pyoceaneus-Sepsis

Laborbefunde am Tag der Untersuchung: am 8.3.1972

Hb:	9,6 g %
Ery:	3,09 Mill.
Leuko:	750 (Gran 50 rel%)
Thromboz.:	2.000 (Kammer)

Die Patientin war vom 19.2.1972 bis 12.3.1972 in stationärer Behandlung. Tod durch nicht beherrschbare gastrointestinale Blutung sowie Harnwegsblutung.

Patientin C geb. 7.9.1959 Schülerin

Diagnose: Rezidiv einer akuten lymphatischen Leukämie mit Thrombopenie.
Hämorrhagische Diathese mit Petechien und Hämatomen, Conjunctivalblutung, Blutung im rechten Gehörgang und Blutungen der Gingiva.

Laborbefunde am Tag der Untersuchung: am 22.3.1972

Hb:	11,7 g %
HKT:	34,9 %
Ery:	3,84 Mill.
Leuko:	920 (Lympho. 94 %)
Thromboz.:	9.000 (Kammer)

Patientin D geb. 19.3.1925 Hausfrau

Diagnose: 3. Schub einer akuten Monozytenleukämie mit Thrombopenie. Keine Blutungen.

Ergebnis der Myelotomie: Monozytenleukämie mit weitgehendem Ersatz einer regelrechten Myelopoese.

Laborbefunde am Tag der Untersuchung: am 24.4.1972

Hb:	9,5 g %
Ery:	2,73 Mill.
Leuko:	1.370
Thromboz.:	16.000 (Kammer)

Patientin E geb. 19.9.1909 Rentnerin

Diagnose: Akute Knochenmarksaplasie mit Anaemie, Leukopenie und Thrombozytopenie. Bisher kein Antikörpernachweis möglich. Kein Antikörpermangelsyndrom. Blutungsneigung mit Hämatomen an Extremitäten.

Laborbefunde am Tag der Untersuchung: am 31.5.1972

Hb:	7,7 g %
HbE:	33,8
Ery:	2,28 Mill.
Leuko:	1.190
Thromboz.:	13.000 (Kammer)

---

b) Versuchsanordnungen

Das durch Venenpunktion gewonnene Blut wurde zur Herstellung von je 20 Einzelproben verwendet. Diese 20 Einzelproben wurden nach unserer Methode weiterverarbeitet und jeweils dreimal gemessen. Das Blut der Patientin A wurde an drei verschiedenen Tagen untersucht, das Blut der übrigen Patientinnen nur einmal, so daß sich 7 Versuchsreihen ergaben.
Eine Versuchsreihe mit Patientenblut A wurde dabei zugleich so durchgeführt, daß eine Aussage über die zeitliche Haltbarkeit der Proben gemacht werden konnte.
Die Versuchsreihe mit Patientenblut E wurde gleichzeitig zur Testung der neuen, mit einem EDTA-Salz beschichteten Reagenzröhrchen der Firma Greiner herangezogen.

c) Gesichtspunkte und Methoden zur Auswertung der Meßdaten

Die angegebene Thrombozytenzählmethode mit dem Coulter Counter wurde nach mehreren Gesichtspunkten geprüft:

1.) Gegenüberstellung Coultermessung - Kammerzählung
Der Mittelwert, der sich aus den 20 Einzelproben bei der Coultermessung ergab, wurde dem Ergebnis der Kammerzählung aus noch zu erwähnenden Gründen lediglich gegenübergestellt.

2.) Statistische Auswertung der Messergebnisse
aa) Um eine Aussage über den Fehler zu machen, der zwischen den 20 Einzelproben entstand, wurden die Ergebnisse der Messungen mit einer Olivetti Tischrechenmaschine ausgewertet.

Programm:		
	Probenzahl	n
	Mittelwert	$\overline{x}$
	Standardabweichung der Einzelwerte	σ
	Variationskoeffizient	v
	Standardabweichung vom Mittelwert	$\sigma_{\overline{x}}$

Die Variationskoeffizienten, die sich bei den verschiedenen Versuchsreihen ergaben, wurden sodann nach dem gleichen Programm nochmals beurteilt.

bb) Um festzustellen wie sich eine Probe bei mehrmaliger Messung verhält, wurden drei Versuchsreihen mit den je 60 Einzelwerten folgendermaßen überprüft:
Mit Hilfe des Mittelwertes, der sich durch dreimalige Messung einer Probe errechnen ließ, wurden die prozentualen Abweichungen der Einzelmessungen festgestellt. Diese Werte der prozentualen Abweichung (pro Versuchsreihe also 60 Einzelwerte) wurden nach dem unter aa) aufgeführten Programm beurteilt.

3.) Um die zeitliche Haltbarkeit der Proben beurteilen zu können, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der Proben zu verschiedenen Zeiten verarbeitet und gemessen wurden. Die Meßergebnisse wurden gesondert aufgeführt, aber auch zusammen mit den Ergebnissen der anderen Versuchsreihen ausgewertet.

4.) Auf der "Analytica 72" wurden Kunststoffröhrchen mit einer EDTA-Beschichtung gezeigt. Wir prüften in einer Versuchsreihe, ob diese Möglichkeit das abgenommene Blut zu antikoagulieren zu gleichen Ergebnissen führt, wie sie mit der Titriplexlösung erzielt werden können.

C. ERGEBNISSE

I. Elektrische Abschirmung des Coulter-Meßgerätes

Auf Grund der äußeren Interferenzstörungen war der Coulter Counter Modell "F" bei uns zunächst für eine genaue Thrombozytenzählung schlecht brauchbar, zu verschiedenen Tageszeiten war eine Zählung bei den notwendigen Einstellungen völlig unmöglich.

Der Grad dieser exogenen Störungen läßt sich leicht ermitteln (Manual 6), wenn man sich folgender Methode bedient:

Am Schwellenwertschalter wird die niedrige, für die Zählung erforderliche Schwelle eingestellt, die Verstärkung bei der benötigten Stellung belassen, die Stromstärke aber auf 0 zurückgeschaltet. Gleich, ob dem Gerät nun eine thrombozytenhaltige Probe oder reiner Elektrolyt angeboten wird, es darf keine Partikelzählung registriert werden, auf dem Bildschirm der Kathodenstrahlröhre dürfen keine Impulse erscheinen. Kommt dennoch ein "count" zustande, so ist er nur durch Interferenz bedingt und zeigt in seiner Höhe an, in welchem Maße das Gerät von außen beeinflußt wird.

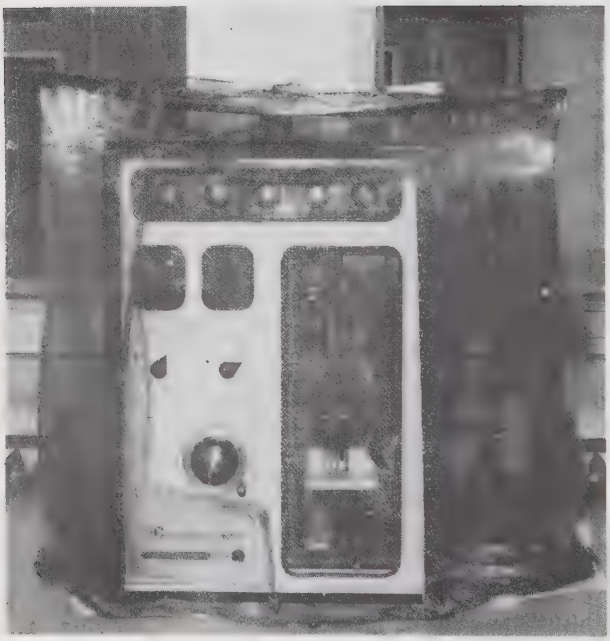
Wie stark und mit welcher Unregelmäßigkeit diese Störungen in unserem Falle auftraten, zeigt nachstehende Tabelle. Ebenso ist dargestellt, wie die Störungen sich bei verschiedenen Erdungen des Gerätes auswirken und welche Abschirmung durch den von uns angefertigten und benutzten Faraday'schen Käfig (siehe Bild) erzielt werden kann.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Störungseinfluß durch beide Erdungsarten nur etwas abgeschwächt wird; stets aber bleiben starke Schwankungen bestehen.

Obwohl die Störungen nicht an jedem Tage so extrem auftraten, war eine bessere Abhilfe notwendig.

Tabelle I: Wirkung der elektrischen Abschirmung des Gerätes Coulter Counter Modell "F"
(Schwelle 6, Verstärkung 0.500, Stromstärke "off")

	Gerät ohne Erdung	Gerät mit angeklemmtem Erdungsdraht	Gerät mit angeklemmter starker Kupferdrahterdung	Gerät im Faraday'schen Käfig
"counts" nur durch Interferenzstörungen von außen: gemessen im Abstand von etwa 3 Minuten am 25.2.1972 Beginn 15.oo h	1500	1200	1100	0
	1900	1500	1200	0
	2300	2000	1500	0
	1500	1200	1000	0
	1500	1200	1100	0
	2600	2000	1600	0
	1100	1000	800	0
	1200	1000	800	0
	1900	1500	1200	0
	2300	1800	1500	0
	2300	1700	1600	0
	3100	2300	1800	0
	1500	1100	1100	0
	1400	1100	1000	0
	2300	2000	1500	0
	2300	1900	1400	0
"counts" nur durch Interferenzstörungen von aussen gemessen im Abstand von ca.1.ooh am 25.2.1972	800 (8h)	700	500	0
	2000 (9h)	1500	1300	0
	1500 (10h)	1200	1000	0
	3300 (11h)	2500	1800	0
	2900 (12h)	2000	1600	0
	2000 (13h)	1600	1300	0
	3600 (14h)	2500	2000	0
	1500 (15h)	1200	1100	0
	2600 (16h)	2200	1700	0
"counts" nur d.I. v.außen nach 17h in 1/2h Abstand	über 10000	über 10000	2300	0
	über 10000	über 10000	2100	0
	über 10000	über 10000	2400	0
	über 10000	über 10000	2000	0



Der im Bild gezeigte Faraday'sche Käfig brachte den gewünschten Erfolg.
Das Gerät arbeitet völlig störungsfrei, wie sich aus Tabelle I ersehen läßt.

II. Versuchs- und Auswertungsergebnisse

Die Voraussetzungen, die gegeben waren und die Vorversuche, die nötig wurden, um die angegebene Methode zur Thrombozytenzählung bei stark erniedrigten Plättchenkonzentrationen zu entwickeln, sind im Teil D dieser Arbeit, zusammen mit der Methodik von BALLEISEN (1) erörtert. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse wiedergegeben, die die abschließende Testung unserer Methode ergab.

1) Gegenüberstellung Coultermessungen - Kammerzählungen
Tabelle II

Patient	Thrombozytenzahl/mm^3 Coulterzählung (Mittelwert aus 20 Einzelproben)	Thrombozytenzahl /mm^3 Kammerzählung	
Patient A 28.2.1972	12.849	9.000	Bestimmung extra durchgeführt
Patient A 6.3.1972	13.519 (aus 24 Einzelproben)	22.000	Klinik-Routinezählung
Patient A 16.3.1972	11.909	7.500	(Mittel aus 20 Zählungen extra durchgeführt)
Patient B 8.3.1972	4.446	2.000	Klinik-Routinezählung
Patient C 22.3.1972	4.825	9.000	Klinik-Routinezählung
Patient D 24.4.1972	11.397	16.000 11.500	Klinik-Routinezähl. Bestimmung extra durchgeführt
Patient E 31.5.1972	11.610	13.000	Bestimmung extra durchgeführt

Die angegebenen Kammerzählungen wurden alle nach der Methode von Marx und Derlath mit Hilfe einer Neubauer-Kammer durchgeführt. Es ist angegeben, ob die Kammerzählung als Routinezählung in der Klinik stattfand oder aber von einer besonders zuverlässigen med.techn. Assistentin durchgeführt wurde, um den Vergleichswert zu erhalten.
Um einen Anhaltspunkt zu geben wie die Kammerbestimmung in diesem Extrembereich arbeitet, wurde folgender Versuch unternommen:
Aus der gleichen Blutprobe, aus der am 16.3.1972 (Patient A) die 20 Verdünnungen für unsere Coultermessungen angefertigt wurden, beschickte eine med.techn. Assistentin 20 Neubauer-Kammern. Dabei wurden aus einer Pipette je zwei Kammern gefüllt. Nach einer Wartezeit von mindestens 1/4 h (feuchte Kammer) wurden jeweils gleiche Gruppenquadrate ausgezählt.
Das Ergebnis der Kammerbestimmungen zeigt die folgende Tabelle III:

Pipette Nr.	Pipetten-fehler	Kammer Nr.	mikrosk. Zählung	xUmrechnungs-faktor 1.000	da EDTA-Blut 1:5 x zus.Faktor 5/4 = Thromb./mm^3 Blut
1	± 1 %	1	3	3000	3750
		2	3	3000	3750
2	± 3 %	3	5	5000	6250
		4	3	3000	3750
3	± 3 %	5	3	3000	3750
		6	8	8000	10000
4	± 3 %	7	5	5000	6250
		8	4	4000	5000
5	± 3 %	9	8	8000	10000
		10	11	11000	13750
6	± 3 %	11	3	3000	3750
		12	6	6000	7500
7	± 3 %	13	6	6000	7500
		14	8	8000	10000
8	ohne Ang.	15	6	6000	7500
		16	4	4000	5000
9	ohne Ang.	17	12	12000	15000
		18	13	13000	16250
10	ohne Ang.	19	5	5000	6250
		20	5	5000	6250

Die statistische Auswertung ergibt für diese 20 Kammer-Zählungen:

Proben	20
Mittelwert	7.525
Standardabweichung	3.776
Variationskoeffizient	50,1 %
Standardabweichung des Mittelwertes	844

Obwohl aus diesem einzelnen Versuch kein Urteil über die Kammerzählmethode abgeleitet werden kann, geht zumindest hervor, welche Fehlerbreite bei dieser Plättchenbestimmung, auch wenn sie von einer geübten Assistentin angewendet wird, zu erwarten ist. Wir halten daher einen exakten statistischen Vergleich zwischen den in der Methodik so unterschiedlichen Verfahren zur Thrombozytenbestimmung (Coultermessungen-Kammerzählungen) bei der Plättchenzählung ganz krasser Thrombopeniefälle für wenig sinnvoll. Die Gegenüberstellung der Werte, die mit unserer Methode ermittelt und der Werte, die mit der Kammerzählung erzielt wurden, zeigt aber trotzdem, daß dem Krankheitsgeschehen entsprechende Ergebnisse mit beiden Methoden erreichbar waren und daß es bei den Coulter-Zählungen nicht zu einer konstanten Erhöhung oder Senkung der Zählrate im Vergleich zu den Kammerergebnissen kam.
Von großer Bedeutung war es nun zu ermitteln, ob die Reproduzierbarkeit der Coultermessungen sich auch in diesem Extrembereich und bei unserer Methode in den engen Grenzen bewegen würde, die andere Autoren und auch BALLEISEN (1) für den Normbereich fanden.

2)aa) Abweichung der Einzelproben jeder Versuchsreihe (Coultermessungen)
Die folgende Tabelle IV zeigt die Mittelwerte der jeweils dreifachen Messung von 20 Einzelproben jeder Versuchsreihe.

Tabelle IV

Probe	Pat. A 28.2.72	Pat. A 6.3.72	Pat. A 16.3.72	Pat. B 8.3.72	Pat. C 22.3.72	Pat. D 24.4.72	Pat. E 31.5.72
1	13.890	13.010	12.260	4.452	4.596	11.500	11.030
2	12.130	13.180	11.580	4.497	4.725	11.080	11.560
3	12.220	13.120	11.320	3.716	4.831	11.620	11.140
4	13.340	13.020	13.220	4.798	5.066	11.510	11.530
5	13.070	12.900	13.180	5.024	4.647	11.430	11.680
6	13.410	13.840	11.710	5.058	5.225	11.620	11.780
7	12.770	12.820	12.360	3.893	4.698	11.410	11.590
8	13.170	13.560	11.680	4.169	4.587	10.890	11.860
9	12.150	13.210	11.280	4.545	4.933	10.930	11.050
10	12.270	13.640	11.320	5.178	4.796	11.280	11.260
11	12.110	14.460	11.300	4.494	4.620	11.320	11.140
12	12.690	14.850	11.220	3.610	4.780	11.530	11.630
13	13.370	13.320	12.070	4.231	5.133	10.660	11.730
14	12.670	13.450	12.730	4.453	4.616	11.680	11.750
15	12.440	13.620	11.400	4.573	4.724	11.420	12.120
16	13.280	13.410	11.670	4.170	4.836	11.440	11.580
17	12.720	12.950	11.760	4.166	4.829	11.970	11.870
18	11.900	13.880	11.090	4.564	5.056	11.820	11.710
19	13.480	14.080	12.280	4.569	4.755	11.410	11.960
20	13.910	13.640	12.770	4.763	5.055	11.430	11.770
21		13.850					
22		13.990					
23		13.720					
24		12.940					

Die Tabelle V zeigt die statistische Auswertung von jeweils 20 Einzelproben eines Patienten.

Tabelle V

Patient	Probenzahl	Mittelwert	Standardabw.	Variations-koeffizient (%)	Standardabw. des Mittelw.
Patient A 28.2.1972	20	12.849	615,7	4,oo	137,7
Patient A 6.3.1972	24*)	13.519	515,1	3,oo	105,3
Patient A 16.3.1972	20	11.909	663,7	5,oo	148,4
Patient B 8.3.1972	20	4.446	419,52	9,oo	93,85
Patient C 22.3.1972	20	4.825	192,16	3,oo	42,94
Patient D 24.4.1972	20	11.397	314,67	2,7	70,36
Patient E 31.5.1972	20	11.610	278,61	2,3	62,30

*) dieser Versuch war gleichzeitig Zeitversuch und hat deshalb 4 Proben mehr.

Die Variationskoeffizienten, die sich bei den 7 Versuchsreihen ergaben, wurden nochmals ausgewertet:

Zahl der Versuchsreihen	7
Variationskoeffizient	4,14% ± 4,64% (2 σ)
Variation des Variationskoeffizienten	56,00 %
Standardabweichung des Mittelwertes	0,87 %

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ablesen, daß der Messfehler bei einem Variationskoeffizienten von 4,14 ± 4,64 (2 σ) mit etwa 4 % trotz der großen methodischen Schwierigkeit der Thrombozytenzählung bei extremer Thrombopenie relativ niedrig ist. Die Fehlerbreite der Kammerzählung liegt bei optimaler Technik mit ca. 50 % etwa um eine Zehnerpotenz höher.

bb) Abweichung beim mehrfachen Messen einer Probe
Als nächstes sollte beurteilt werden welcher Fehler entsteht, wenn eine Probe mehrfach gemessen wird. Diese Abweichung setzt sich aus dem "Instrumentenfehler" des Gerätes und dem Fehler durch unterschiedliche Behandlung der Probe unmittelbar vor dem Meßvorgang zusammen. Die Überprüfung bei drei Versuchsreihen ergab:

Tabelle VI

	Fälle	Mittelwert (Fehler in%)	Standardabw.	Variations-koeffizient	Standardabw. d. Mittelwertes
Pat. A 16.3.72	60	1,57	0,99	63,00	0,12
Pat. C 22.3.72	60	1,88	1,37	72,00	0,17
Pat. D 24.4.72	60	1,24	0,868	70,00	0,112

Es läßt sich ersehen, daß die unmittelbar beim Meßvorgang entstehenden Fehler sehr gering sind und wesentlich niedriger liegen als die bei der Kammerzählung entstehenden Fehler.

3) Die zeitliche Haltbarkeit der Proben
Die Versuchsreihe mit Patientenblut A am 6.3.1972 erfolgte zugleich so, daß die zeitliche Haltbarkeit der Proben festgestellt werden konnte.

Blutabnahme 9.15 h.
Sofortige Herstellung der Verdünnung 1 - 20.
Die weitere Verarbeitung und Messung von je 2 Proben fand zu den angegebenen Zeiten statt und brachte folgende Ergebnisse:

Tabelle VII

Proben	Zeit	Thrombozytenkonz./mm^3 Blut	
1 + 2	10.15h	13.010	13.180
3 + 4	11.15h	13.120	13.020
5 + 6	12.15h	12.900	13.840
7 + 8	13.15h	12.820	13.560
9 + 10	14.15h	13.210	13.640
11 + 12	15.15h	14.460	14.850
13 + 14	16.15h	13.320	13.450
15 + 16	17.15h	13.620	13.410
17 + 18	18.15h	12.950	13.880
19 + 20	19.15h	14.080	13.640

Die Proben 21 - 26 wurden nicht sogleich nach Blutabnahme angefertigt, sondern das Blut wurde zunächst einige Zeit gekühlt aufbewahrt.

Die Tabelle VIII gibt Aufschluß über Verdünnungszeit und Meßergebnis.

Tabelle VIII

Proben	Verdünnungszeit und weitere Aufbereitung	Meßergebnis Thromboz./mm^3 Blut	
21 + 22	10.30h	13.850	13.990
23 + 24	11.30h	13.720	12.940
25 + 26	13.30h	16.300	16.800

Aus der ersten Tabelle ist ersichtlich, daß nach sogleich erfolgter Verdünnung einer Probe die weitere Verarbeitung sehr lange (wir prüften über einen Zeitraum von 10 Std.) aufgeschoben werden kann, ohne, daß es zu Thrombozytenverlusten kommt oder die Messung durch andere Fehlerquellen beeinflußt wird. Ebenso verhalten sich die erzielbaren Ergebnisse (Tabelle VIII), wenn die Ausgangsverdünnung innerhalb eines Zeitraumes von etwa 2 Stunden hergestellt wird. Wir haben die aufgeführten Messungen zusammen mit den anderen Versuchsreihen statistisch ausgewertet, um zu zeigen, daß sich bei ihrer Beurteilung keine bedeutenden Abweichungen ergeben.
Aus der Tabelle VIII geht hervor, daß eine Anfertigung der Ausgangsverdünnung 4 Std. nach Blutabnahme zu falschen hohen Werten führt.
Wir halten es deshalb für zweckmäßig, die Ausgangsverdünnung grundsätzlich sofort herzustellen und erst dann, sollte es nötig sein oder sollen mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden, die weiteren Arbeitsgänge zu verschieben.

4) Prüfung EDTA-beschichteter Röhrchen
Die Überprüfung, ob die neuen EDTA-beschichteten Röhrchen zu den gleichen Ergebnissen führen, wie sie zu der Antikoagulierung des Blutes mit Titriplex III-Lösung erreichbar sind geschah in folgender Weise:
Bei Patient E wurde zunächst nach Venenpunktion in der bisher geübten Art Blut unter Vorgabe von Titriplex III abgenommen und für die Verdünnung Nr. 10 - 20 verwendet.

Anschließend ließen wir aus der in der Vene verbliebenen Punktionskanüle etwa 2 ml Blut in das EDTA-beschichtete Spezialröhrchen tropfen und verarbeiteten dieses Blut in den Proben 1 - 10 weiter.
Bei der Errechnung der Thrombozytenkonzentration /mm^3 Blut konnte dann der Spritzenfaktor (5/4) wegfallen und nach der Zweistufenmessung mußte der Differenzwert nur noch mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert werden.
Die Ergebnisse der Messungen sind aus den Tabellen IV und V ersichtlich. Beide Methoden zur Antikoagulierung des Blutes sind gleichwertig. Die Umrechnung des gemessenen Wertes auf die tatsächliche Blutkonzentration wird bei dem neuen EDTA-beschichteten Röhrchen etwas erleichtert.

D. BESPRECHUNG

Unsere Versuchsreihen, die mit Blutproben von Thrombopeniepatienten durchgeführt wurden, haben gezeigt, daß Thrombozytenbestimmungen mit der angegebenen Methode in diesem Extrembereich möglich sind und daß gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Damit stellt dies Verfahren eine Ergänzung der von BALLEISEN (1) an unserem Institut entwickelten Methode zur Thrombozytenzählung dar. Das Verfahren von BALLEISEN (1) zur Ermittlung höherer, im Normalbereich und über der Norm liegender Thrombozytenkonzentrationen läuft nach folgender Systematik ab:

1) Blutabnahme venös oder kapillar
2) Verdünnung 1 : 2.000
3) Einmalige Zentrifugation im Winkelaufsatz (45°) bei 85 g für 5 Minuten
4) Zweistufenmessung

Mit dem geringen Mehraufwand unserer Abwandlungen

1) Verdünnung 1 : 200
2) Doppelte Anwendung der Zentrifugationstechnik

ist es nun möglich, bei entsprechendem Einsatz der beiden Verfahren, den gesamten Bereich von Thrombozytenkonzentrationen im Blute zu erfassen.
Die erfolgreiche Anwendung des Faraday'schen Käfigs zur elektrischen Abschirmung des Coulter Counters ist nicht an unsere Methodik gebunden oder als Grundvoraussetzung damit verknüpft, wird aber immer dort von Nutzen sein, wo äußere Interferenzstörungen die Arbeit mit dem Gerät in gleicher Weise wie bei uns beeinflussen oder sogar unmöglich machen.

1) Voraussetzungen für die eigene Methodik
   Bei der Entwicklung der eigenen speziellen Methodik konnten die grundlegenden Angaben von BALLEISEN (1) verwertet werden, besonders da angestrebt wurde, dies Verfahren zur Thrombozytenbestimmung durch möglichst geringen methodischen und technischen Mehraufwand zu ergänzen, um einen Routinegebrauch im hämatologischen Labor nicht zu erschweren.

Behältermaterial:
Zur Vermeidung von Thrombozytenverlusten während der Probenaufbereitung wurden die Polystyrolröhrchen zur Aufnahme des abgenommenen Blutes und für den Zentrifugationsvorgang weiterverwendet. BALLEISEN (1) hatte festgestellt, daß der Gebrauch von Glaszentrifugengläsern sich auf die Thrombozytenausbeute sehr nachteilig auswirkt und auch die Aufbewahrung des abgenommenen Blutes in einem Glasgefäß zu Verlusten von Blutplättchen führt. Wurden diese Gefäße vorher silikonisiert traten keine Verluste auf. Verwendete man Kunststoffröhrchen, so ließen sich gleich gute Ergebnisse wie mit den silikonisierten Gläsern erzielen. Die einfachere Benutzung des Polystyrol-Behältermaterials führte zu seiner Anwendung.
Der günstige Effekt der Kunststoffröhrchen auf die Thrombozytenausbeute läßt sich damit erklären, daß eine Bindung von Thrombozyten an die positiv geladene Kunststoffoberfläche nicht zustande kommt, während eine Adhäsion von Blutplättchen an der negativen Glasoberfläche über Ca^{++}-Brückenbildung auftritt (21). Es findet sich somit bei den Polystyrolröhrchen kein Partner für das Anhaften von Thrombozyten, der zu Aggregatbildung Anlaß geben könnte.
Diese Vorteile werden auch von anderen Autoren (5, 8, 19, 24) bei ihren Thrombozytenzählungen mit dem Coulter Counter ausgenutzt.
Suspensionsmedium:
Das von BALLEISEN (1) angegebene Suspensionsmedium, ein Gemisch von ISOTON-PERISTON-Na_2 EDTA im Verhältnis 22:2:1 wurde ebenfalls beibehalten.
Die Verwendung von Isoton als Hauptbestandteil ist wegen der Partikelarmut von Vorteil, der NaN_3 Zusatz verhindert auch in unserem Gemisch den Bakterienbefall; beides trägt dazu bei, den "background" der Lösung niedrig und konstant zu halten.
Der Zusatz des Plasmaexpanders PERISTON-Bayer, dessen für uns wichtiger Bestandteil Polyvinylpyrrolidon ist, erfolgte wegen der BSG beschleunigenden Eigenschaft dieser Substanz. Günstig ist es, daß Polyvinylpyrrolidon in dem genannten Blutersatzmittel natürlich in einer dem Blut isotonen Lösung vorliegt. BULL (5) und GREBE (14) benutzen ebenfalls einen Polyvinylpyrrolidon-Zusatz bei ihren Thrombozytenseparationen (beides Sedimentationsmethoden) vor der Zählung im Counter.

Bei der Methode von BALLEISEN (1) ist der genannte Zusatz von entscheidender Bedeutung. Ohne PERISTON kam es bei der Zentrifugation stets zu großen und nicht kalkulierbaren Thrombozytenverlusten.
Dabei ist der genaue Wirkmechanismus von Polyvinylpyrrolidon unklar.
Na_2 EDTA besitzt gegenüber Citrat mehr Vorzüge (21,3,9,25) und wird auch von den anderen Autoren von Thrombozytenzählungen mit Partikelzählgeräten verwendet.
Zentrifugationstechnik:
Der Unterschied im spezifischen Gewicht von Erythrozyten und Thrombozyten ist relativ gering. Aus diesem Grunde und um eine allgemein schonende Zentrifugation zu erreichen hatte BALLEISEN (1) versucht, eine Trennung bei niedriger Zentrifugationsgeschwindigkeit durchzuführen. Gute Ergebnisse wurden nur in 45°-Einsätzen bzw. entsprechend ausschwenkenden Behältern erreicht. Von Vorteil ist dabei offenbar der geringe Sedimentationsweg der Erythrozyten zur Wand des Zentrifugenglases und die große Niederschlagsfläche. Die besten Ergebnisse in bezug auf Thrombozytenausbeute wurden mit 85 g für 5 Minuten erzielt. BALLEISEN (1) fand, daß diese Methode der Zentrifugation bei einer Verdünnung von 1 : 2.000 den erforderlichen Separationseffekt ausübte.

2) Entwicklung der eigenen Methodik
Den Ausführungen von HERBINGER (15) und MAYR (20) ist zu entnehmen, daß der statistisch zu erwartende Zählfehler bei einem Partikelzählgerät entscheidend dadurch gesenkt wird, daß die absolute Zahl der gezählten Teilchen sehr hoch liegen kann. In Vorversuchen mit der Methode von BALLEISEN (1) bei Thrombozytenkonzentrationen, die mit der Kammer auf etwa 10.000 Thrombozyten/mm^3 bestimmt wurden, ergab sich, daß zwar bei einzelnen Zählungen auch mit dem Coulter Counter vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten, die Reproduzierbarkeit verschiedener Proben, die nach einer Blutabnahme hergestellt wurden, war aber unbefriedigend, d.h. die auftretenden Schwankungen der Einzelwerte waren so extrem, daß die Ergebnisse keine Aussagekraft mehr besaßen.
Geringste Fehler beim Herstellen der Verdünnung, evtl. kleine Fehler bei der Zentrifugation (Geschwindigkeit, Zeit), unterschiedliche Behandlung beim Aufschütteln einer

Probe, alles mußte sich bei der niedrigen Thrombozytenkonzentration sehr stark auswirken. Allgemein die Tatsache, daß die günstige Möglichkeit, den Coulter Counter eine große Menge Zellen zählen zu lassen, nicht ausgenutzt wurde, läßt dieses Versagen erklären. Bei einer Verdünnung von 1:2.000 für Thrombozytenkonzentrationen um 10.000/mm^3Blut, läge die tatsächlich vom Counter gezählte Plättchenzahl bei 500.
Um die genannten Fehlermöglichkeiten zu reduzieren und um den Coulter Counter eine größere Anzahl von Thrombozyten bei der Bestimmung von thrombopenischem Blut anbieten zu können, mußte demnach eine geringere Ausgangsverdünnung gewählt werden. Versuche mit einer Verdünnung von 1 : 1.000 brachten aber noch keinen wesentlichen Fortschritt. Auch war bereits bei dieser Verdünnung die Erythrozytenkontamination nach der Zentrifugation oftmals zu stark, um die Thrombozytenzählung zu ermöglichen. Nach zahlreichen weiteren Versuchen gelang es schließlich durch Verdoppelung des Zentrifugationsvorganges bei der geringen Verdünnung von 1 : 200 Zählungen durchzuführen, die der Kammer vergleichbare Werte brachten und die die Forderung nach guter Reproduzierbarkeit erfüllten. Die Vorzüge der apparativen Zählung, die weiterhin in der einfachen Handhabung und dem automatisch ermüdungsfreien Zählvorgang, sowie der Schnelligkeit der Zählung bestehen, konnten damit auch für unsere Methode voll genutzt werden.
Die notwendigen Änderungen in bezug auf die Ausgangsmethode sind gering. Die Tatsache, daß bei unserer Verdünnung 1 : 200 nach dem ersten, wie bei BALLEISEN (1) ablaufenden Zentrifugationsvorgang wieder die gleiche Ausgangssituation geschaffen wird bevor nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wird, verhindert es offenbar, daß es zu merklichen Thrombozytenverlusten kommt. Trotz der zehnmal geringeren Verdünnung, die wir verwenden, liegt die absolute Thrombozytenzahl in der Zentrifugations- und Meßlösung nicht höher als in der von BALLEISEN (1) benutzten Verdünnung, was hier wie dort die Neigung zur Aggregatbildung wohl selbst schon in gewissem Maße verhindern hilft.
Bis hinab zu einer Thrombozytenkonzentration von etwa 4.500/mm^3 Blut ließ sich zeigen (siehe Versuchsreihe), daß die von uns angegebene Verdünnung ausreicht, um

eine reproduzierbare Zählung zu ermöglichen.
Mit der doppelten Zentrifugation erreichen wir eine Verminderung der Erythrozytenkontamination auf etwa 1/150 bis 1/250 des Ausgangswertes, was immer genügte, um die Thrombozytenzählung nicht zu beeinflussen.
Beim Meßvorgang benutzten wir stets die für unsere Zählhöhen günstige Durchflußmenge von 0,1 ml. Der Meßvorgang läuft dadurch auch sehr rasch ab, sogar wenn Doppelmessungen zur Mittelung durchgeführt werden und man, wie erwähnt, mit der Zweistufenmethode arbeiten muß. Von Vorteil ist dies auch wenn Verstopfungen der Meßkapillare auftreten. Die Verlegung der Kapillare ist selten und wird allenfalls durch Schmutzpartikel einer Größe bedingt, die auch eine 100 µ -Kapillare verlegen würden.
Im Gegensatz zu BALLEISEN (1) verwendeten wir nur venöses Blut für unsere abschließenden Versuchsreihen. Wir mußten uns darauf beschränken, weil die angewendeten Überprüfungen anders nicht möglich waren und mehrfache Blutabnahme aus der Fingerbeere den schwerkranken Patienten nicht zugemutet werden konnte. Grundsätzlich ist es möglich, die benötigte Blutmenge von 0,1 ml auch mit dem Hämostilett aus dem Finger zu gewinnen. Einzelne Messungen, die wir durchführten, gaben gleiche Ergebnisse wie mit dem durch Venenpunktion gewonnenen Blut. Eine genaue Überprüfung dieser Möglichkeit konnte wegen der geringen Zahl der Versuche nicht vorgenommen werden.
Dazu ist auch zu bemerken, daß die ausschließliche Verwendung von venösem Blut für die Messung mit dem Partikelzählgerät nicht ungewöhnlich ist (8,10,12,14,17,24).

Nur bei den Methoden von BULL (5), EASTHAM (11) und MAYNE und CARVILLE (19) -besonders aber von BALLEISEN (1)- wird zusätzlich die Verwendung von Blut aus der Fingerbeere vorgeschlagen.

3) Elektrische Abschirmung des Gerätes
Obwohl der Coulter Counter Modell "F", mit dem alle Messungen durchgeführt wurden, schon immer Störungen durch Interferenzeinflüsse zeigte, waren diese zunächst nicht so schwerwiegend, daß sie die Meßergebnisse allzu stark beeinflussen konnten. Nur in den Abendstunden war eine Messung völlig unmöglich. Die fälschlichen "counts" durch

Interferenz, die von externen elektrischen Feldern stammten, ließen sich auch mitzählen, wenn der "background" mit dem Suspensionsmedium ermittelt wurde. Damit wurden die Störungen beim Abzug dieses "Leerwertes" der Lösung ebenfalls ausgeklammert. Eine häufige Bestimmung des Leerwertes wurde allerdings Voraussetzung, da der Störungseinfluß in zunehmendem Maße schwankte. Schließlich aber wurden während unserer Vorversuche, offenbar durch neues Hinzukommen unentstörter elektrischer Geräte in der Nachbarschaft die Störungen so stark und schwankend, daß die Arbeit mit dem Gerät unmöglich wurde. Nach verschiedenen Versuchen das Gerät zu erden, brachte erst die Installation des Faraday'schen Käfigs den gewünschten Erfolg. Wir stellten diese Abschirmung ohne Hilfe eines Handwerkers innerhalb kürzester Zeit her (Beschreibung der Einzelheiten siehe eigenes Kapitel). Sollte es auch anderorts nötig sein, einen derartigen F-Käfig zu benutzen empfiehlt es sich im einzelnen Falle zu testen, ob die Tür vor dem Bedienungsteil des Gerätes überhaupt angebracht werden muß oder ob dieser Raum völlig frei gelassen werden kann. Dies ist von der Richtung abhängig, aus der die Störungen kommen. Wichtig ist es aber in jedem Falle, die neben dem Gerät befindliche Flasche mit der Spülflüssigkeit für das innere Glassystem in den F-Käfig miteinzubeziehen.

4) Visuelle Methoden - eigene Methodik

Es ist bekannt, daß die mikroskopisch-visuellen Thrombozytenzählmethoden umso mehr an Präzision verlieren, je niedriger die Thrombozytenzahl/mm^3 Blut bei einem Kranken liegt. Erklärlich ist die Tatsache dadurch, daß bei der Kammerzählung nur eine sehr kleine Anzahl von Thrombozyten erfaßt wird und als Grundlage für die Berechnung dienen muß. (Siehe Tabelle III). Allgemein gilt, daß bei der apparativen Zählung mit einem Partikelcounter dagegen der statistisch zu erwartende Zählfehler entsprechend der viel größeren absoluten Zahl der gezählten Partikel vermindert wird (5,15,20).

Die gute Reproduzierbarkeit der Coulter-Bestimmungen läßt sich außerdem noch dadurch erklären, daß diese Methode, die Thrombozytenkonzentration zu bestimmen, nicht so sehr von der Fähigkeit und Ermüdbarkeit des Bedienenden abhängig ist. Der Variationskoeffizient visueller Zählungen wurde von BRECHER (4) mit 11 % angegeben. Dieser Wert gilt, wenn unter idealen Bedingungen in einem Bereich von 150.000 - 450.000 Thrombozyten/mm^3 gezählt wird. Der von uns

ermittelte Variationskoeffizient für 20 Kammerzählungen aus einer Blutabnahme deutet an, mit welchen Schwankungen man zu rechnen hat, wenn die visuelle Methode bei krassen Thrombopeniefällen angewendet wird. Der für unsere Thrombozytenzählungen mit dem Partikelcounter ermittelte durchschnittliche Variationskoeffizient von 4,1 % liegt auf jeden Fall sehr weit unter dem Wert, der bei der Kammerzählung erreicht werden kann.

5) Andere automatische Methoden - eigene Methodik

Es wurden bisher einige, untereinander verschiedene Methoden für die Thrombozytenzählung mit Partikelzählgeräten entwickelt. Die Autoren EASTHAM (11), BULL (5), GREBE (14), SIPE und CRONKITE (24) bedienen sich verschiedener Sedimentationsmethoden, um die Meßlösung herzustellen.
DAVIS und GREEN (8), EGGLETON und SHARP (12), EASTHAM (10), GIRLING (13), MAYNE und CARVILLE (19) und LANCASTRE (17) bauen ihre Methoden auf verschiedenen Zentrifugationstechniken auf.
Dabei finden sich bei den genannten Autoren nur wenige Angaben über die Arbeitsweise ihrer Methoden bei extrem erniedrigter Plättchenzahl. SIPE und CRONKITE (24) stellen grundsätzlich fest, daß ihr Verfahren bei Thrombozytenwerten unter 100.000/mm^3 Blut nicht brauchbar ist. Aus der Veröffentlichung von MAYNE und CARVILLE (19) ist zu ersehen, daß bis zu einem Wert von 31.000 Thrombozyten/mm^3 herab Blutproben gemessen wurden. Die Ausführungen von BULL (5) lassen erkennen, daß Einzelzählungen in einem Bereich von 4.000 bis 30.000 Thrombozyten/mm^3 Blut zumindest möglich waren. Nähere Angaben sind nicht gemacht.
LANCASTRE (17) führt keine Zählung bei Thrombopeniekranken durch, sondern verdünnt Blut mit normalen Thrombozytenwerten auf 1 : 10 und wendet dann seine Methode an, um zu beweisen, daß Bestimmungen auch bei Niedrigwerten durchgeführt werden können. Die Ergebnisse sind allerdings von sehr beschränktem Wert für die Beurteilung der Methode, da ja auch die sonst störende Erythrozytenkontamination bei dem Verdünnungsschritt stark herabgesetzt wurde.
Auch mit der Methode von BALLEISEN (1) ist es grundsätzlich möglich, niedrige Thrombozytenkonzentrationen zu erfassen. Wie es zu erwarten war, brachte die durchgeführte Prüfung in unseren Vorversuchen allerdings das Ergebnis, daß die erzielbaren Werte keine Reproduzierbarkeit besaßen.

So schwer der Vergleich der ausgearbeiteten Methodik zu der auf ganz anderen Grundlagen aufbauenden Kammerzählung bei thrombopenisch stark veränderten Werten ist, so wenig lassen sich auch Vergleiche zu anderen Zählmethoden mit Partikelzählgeräten ziehen, da keine konkreten Untersuchungen für Thrombopeniefälle vorliegen. Der von uns ermittelte durchschnittliche Variationskoeffizient von 4,1 % zwischen den Einzelproben entspricht aber auch den Angaben für den Normbereich, die von EASTHAM (11) mit 5 %, von MAYNE und CARVILLE (19) mit durchschnittlich 3,5 % und von BULL (5) mit 3,8 % bzw. 4,2 % für ihre Methoden gemacht werden. BALLEISEN (1) fand für seine Methode eine Fehlerbreite von ± 2,9 %. Die Genauigkeit der apparativen Zählung beim mehrfachen Messen einer Probe, die bei uns mit einem Durchschnittsfehler von ± 1,6 % belastet ist, korreliert gut mit den grundsätzlichen Angaben von ± 2 %, die PRUDEN und WINSTEAD (22) für den Instrumentenfehler machen.

6) Genaue Handhabung der angegebenen Methodik

a) Sauberkeitsanforderungen

Um die Zählergebnisse nicht durch Verunreinigungen der Plastik- und Glasgefäße, sowie der zugehörigen Deckel zu verfälschen gingen wir folgendermaßen vor: das gesamte Behältermaterial wurde in einer Reinigungslösung (wir verwendeten Edisonite^{R}) eingeweicht und gewaschen, unter fließendem Wasser gut abgespült und anschließend mit aqua bidest. zweimal ausgeschwenkt. Die Trocknung erfolgte im Trockenschrank. Bei der Aufbewahrung muß jeder Staubeinfall vermieden werden.

Beim Ansetzen der Verdünnungslösung verwendeten wir zur Entnahme von PERISTON und EDTA sterile Spritzen und Kanülen. Bei Beachtung dieser Maßnahmen sollte der "Leercount" der fertigen Verdünnungslösung für die niedrige Schwelle etwa bei 150 - 300 counts/0,1 ml liegen und jeweils konstant sein. Wir hatten Gelegenheit einmal festzustellen, daß sich der "background" nach Zugabe von PERISTON sehr stark erhöhte, ein Geschehen, das offenbar durch Bakterienbefall einer seit längerer Zeit angebrochenen und nicht gekühlt aufbewahrten Flasche bedingt war. Die fertige Verdünnungslösung kann tagelang ohne Minderung ihrer Qualität aufgehoben werden. Es soll erwähnt werden, daß nach den Angaben von BALLEISEN (1) eine Verwendung von PERISTON N, ebenfalls ein Polyvinylpyrrolidon-Produkt, nicht möglich ist, da

sich dadurch der "Leercount" stark erhöht und zudem noch schwankt.
Für die Pflege der Kapillare des Partikelzählgerätes wurde das von der Firma Coulter erhältliche Präparat "Isoterge" nach Vorschrift verwendet.

b) Probenherstellung
Um Gerinnung und Aggregatbildung zu verhindern ist sofortiges gutes Durchmischen des abgenommenen Blutes mit dem vorgegebenen Na_2EDTA selbstverständlich. Grundsätzlich fertigten wir die Verdünnung 1 : 200 sogleich an, doch zeigte der Versuch, daß dies auch noch 1 bis 2 Stunden nach Abnahme möglich war, wenn das EDTA-Blut in der Zwischenzeit gekühlt aufbewahrt wurde. Spätere Verdünnung ist nicht zu empfehlen, es ergeben sich bei der Zählung falsche Werte. Dagegen ist es möglich, das verdünnte Blut lange Zeit bis zur weiteren Verarbeitung aufzuheben (ungekühlt) oder aber auch nach der Zentrifugation bis zur Messung länger aufzubewahren.
Vor der ersten Zentrifugation werden die Proben durch leichtes Schütteln gut durchmischt, wenn sich die zweite Zentrifugation sogleich anschließt ist dies aber nicht nötig, da durch das Dekantieren eine ausreichende Verteilung der Partikel erreicht wird. Um das Resuspendieren der Erythrozyten nach Stehen der Zentrifuge zu vermeiden, sollten nicht mehr als zwei, höchstens aber drei Proben gleichzeitig verarbeitet werden. Es ist zweckmäßig mit offenen Röhrchen zu zentrifugieren, da durch das anderenfalls notwendige Hantieren mit dem Deckel zuviel vom Zentrifugat aufgewirbelt wird oder allein durch den Zeitverlust (bei 3 Proben) zuviel Erythrozyten resuspendieren. Die Zentrifugationszeit von 2 x je 5 Minuten gilt für das Intervall vom Erreichen der Tourenzahl bis zum Abschalten des Motors, danach kann die Zentrifuge auslaufen. Sofortiges Dekantieren schließt sich an, wobei immer darauf zu achten ist, daß dies möglichst vollständig geschieht und nur der letzte Tropfen mit den Erythrozyten verbleibt. Nach der ersten Zentrifugation werden immer noch so viele Erythrozyten mitdekantiert, daß eine Messung unmöglich wäre. Erst das zweite Zentrifugieren sorgt für die nötige Separation. Auf eine möglichst genaue Einhaltung der Zentrifugationsgeschwindigkeit und Zeit ist zu achten. Kleinere Schwankungen bei der Umdrehungszahl wirken sich nicht besonders stark aus. Dies konnten wir bei unseren Zentrifugen

feststellen, die sich nie ganz genau regulieren ließen. Die hier aufgeführte Tabelle IX ermöglicht es leicht, die entsprechende Zentrifugationsgeschwindigkeit für den jeweiligen Radius abzulesen. Die Berechnung der Tabelle basiert auf der Formel:

RZB (in Einheiten g) = $11,18 \times r \times n_1^2$

RZB = relative Zentrifugalbeschleunigung

r = Schleuderradius

n_1 = minütliche Drehzahl n durch 1.000 geteilt

Tabelle IX

Radius cm	U/min.*)	g
5	1230	85
6	1120	85
7	1070	85
8	970	85
9	920	85
10	870	85
11	830	85
12	790	85
13	760	85
14	730	85
15	710	85
16	690	85
18	650	85
20	620	85
25	550	85
30	500	85
35	460	85
40	430	85
50	390	85

*) die angegebenen Werte sind gerundet.

c) Eichung des Gerätes und Meßvorgang

Um die richtigen Einstellungen am Coulter Counter Modell "F" für die Thrombozytenzählung zu finden kann man sich folgender Methoden bedienen:

Gewinnung eines thrombozytenreichen Blutes in angegebener Weise, Verdünnung auf 1 : 2.000 (Methode Balleisen), einmalige Zentrifugation, Einbringung der Probe in Meßposition. Während die Suspension angesaugt wird, muß zunächst die Stromstärke und die Verstärkerstellung so gewählt werden, daß die Höhe der Plättchen-Impulse ungefähr 1/3 der Bildschirmhöhe ausmacht. Nach den Angaben der Firma Coulter (7) trifft dieses beim Modell "F" etwa für die Stromstärke 8 mit Verstärkung 0.500 zu; diese Einstellung ergab sich auch bei uns. Sodann werden bei ansteigenden Schwellenwerten fortlaufend Messungen vorgenommen und in einer Kurve abgetragen (siehe Abbildung II). Es ergibt sich ein Plateau bei niedriger Schwelle und ein Plateau bei hoher Schwelle. Die Schwelleneinstellungen für die Thrombozytenmessung werden jeweils im Anfangsteil der beiden Plateaus gewählt, dabei liegt die Schwelle für die Erythrozytenzählung etwa 10 x höher als die untere Schwelle (z.B. 6 und 60, 7 und 70).

Für unser Gerät ergab sich eine Einstellung von 6 und 70. Dabei folgten wir dem Rat von BALLEISEN (1), die hohe Schwelle nicht nur eine Zehnerpotenz höher zu wählen als die niedrigere, sondern danach noch 10 hinzuzuzählen; der Verlust von großen Thrombozyten läßt sich so besser vermeiden.

Wichtig ist es weiterhin den "background" des Suspensionsmediums festzustellen. Er wird ermittelt indem man bei den gewählten Einstellungen und Schwellen, die als Verdünnungslösung benutzte Mischung zur Messung bringt.

Bevor eine Probe mit dem Gerät gemessen wird ist es von Bedeutung, die Suspension vorsichtig und gleichmäßig durchzumischen. Luftbläschenbildung muß bei dem 2-3maligen Umwenden der Probe vermieden werden.

Das außen vollkommen trockene Glas wird sodann in Meßposition gebracht und das Meßrohr durchgespült. Wichtig ist es darauf zu achten, daß sich auch im inneren Glassystem keine Luftblasen mehr befinden (22). Die Zweistufenmessung wird, mit der hohen Schwelle beginnend, schnell

nacheinander durchgeführt. Wir haben stets bei hoher wie auch bei niedriger Schwelle je 2 x gemessen und dann gemittelt.
Die Überwachung des Meßvorganges durch die drei Kontrolleinrichtungen des Modell "F" (Oscilloskop, optischer Bildschirm, akustisches Signal) läßt leicht Störungen erkennen. Fällt trotzdem einmal ein Einzelcount ganz aus dem Rahmen, ohne daß eine Störung wahrnehmbar ist, empfiehlt es sich, etwas Luft durch die Kapillare ziehen zu lassen und die Messung zu wiederholen.

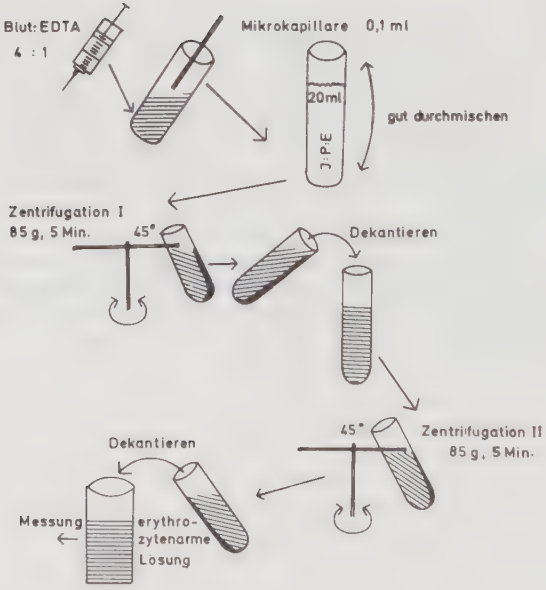
d) Bauanleitung für den Faraday'schen Käfig
Das von uns verwendete Kupfer-Fliegendrahtgitter (Rollenbreite 80 cm, Lagenlänge 4,00 m) kann mit einer herkömmlichen Schere geschnitten werden. Zunächst wird ein Stück von 2,40 m Länge abgetrennt, der Rest in zwei gleiche Teile von je 80 cm zerlegt. Das lange Gitterstück wird zu einer Rolle geformt und um den Counter herumgestellt. Die überlappenden Enden werden mit Draht, der aus dem Gitter gezogen werden kann, miteinander verbunden. Die beiden anderen Gitterstücke dienen als oberer bzw. unterer Deckel. Die überstehenden Ränder werden abgeschnitten oder in sich zusammengerollt. An der Vorderseite des Coulters wird von unten beiderseits des Bedienungsteils beginnend je ein Schnitt hochgeführt, um eine Türe zu schaffen. Dabei darf nur bis 2/3 der Höhe nach oben durchgeschnitten werden, um den Halt des ganzen Käfigs zu gewährleisten; notfalls kann der Rahmen dieser Tür durch einen Draht verstärkt werden. Wichtig ist es die Spülflasche und die Flasche für den Abfallelektrolyt in den Käfig miteinzubeziehen. Die Wirkung der elektrischen Abschirmung ist sonst aufgehoben. Zur besseren Kontrolle der beiden Bildschirme ist es in jedem Falle möglich ein Fenster entsprechender Größe in das Gitter einzuschneiden (auf unserem Foto nicht ersichtlich). Über den evtl. Wegfall der großen Tür für die Bedienung des Gerätes sind bereits Aussagen gemacht worden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

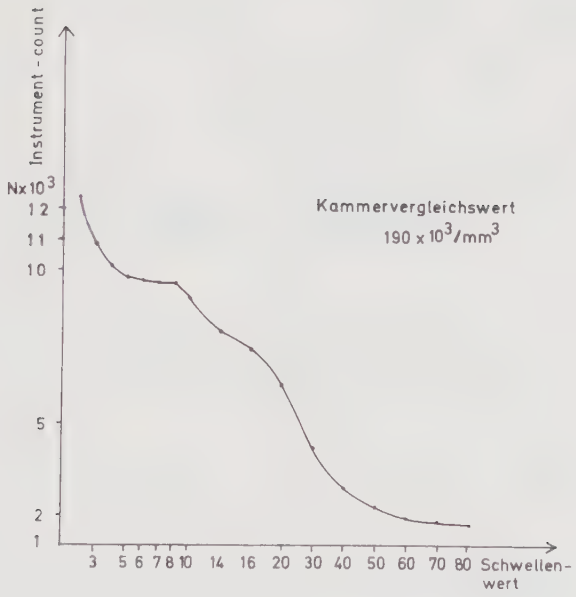
Es wurde eine Methode zur elektronischen Zählung von Thrombozyten entwickelt, die eine genaue, gut reproduzierbare Zählung bei Thrombopenien mit Thrombozytenkonzentrationen unter 15.000/mm^3 Blut erlaubt.
Die Methodik basiert auf einer zweimaligen Zentrifugation einer Suspension von Blutzellen in einem speziellen Medium unter Verwendung von Kunststoffröhrchen zur Verhinderung einer Thrombozytenaggregation und Thrombozytenadhäsion. Die zur elektronischen Zählung nach dem Coulter-Prinzip verwendete Meßlösung ist erythrozytenarm, durch 2-Schwellen-Messung wird die Thrombozytenzahl ermittelt. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse von 7 Meßreihen bei verschiedenen Patienten mit starker Thrombopenie ergab einen Variationskoeffizienten von v_1 = 4,14 $\pm$ 4,64 (2σ)%, der im Vergleich zur Kammerzählung (v_2 = 50,1%) um etwa eine Zehnerpotenz niedriger liegt und die wesentlich größere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der elektronischen Zählung zeigt.
Der Arbeitsaufwand der Methodik liegt nicht über dem der konventionellen Bestimmungstechnik mit Kammerzählung; durch das Fehlen einer mikroskopischen Zählung wird der Ermüdungseffekt visueller Methoden bei größerer Probenzahl vermieden.

F. ABBILDUNGEN

I. Hergang der Probenaufbereitung



II. Eichkurve



Eichkurve zur Thrombozytenzählung
aus Nativblut.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. BALLEISEN, L.
Eine neue Methode zur Thrombozytenzählung im peripheren Blut mit dem Partikelzählgerät "Coulter Counter".
Med.Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München 1972 (im Druck)

2. BEGEMANN, H., RASTETTER, J., KABOTH, W.
Klinische Hämatologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970

3. BORN, G.V.R., CROSS, M.J.
The aggregation of blood platelets.
J. Physiol. 168, 178 (1963)

4. BRECHER, G., SCHNEIDERMAN, M., CRONKITE, E.P.
The Reproducibility And Constancy Of The Platelet Count.
Am. J. clin. Path. 23, 15 (1953)

5. BULL, B.S., SCHNEIDERMAN, M.A., BRECHER, G.
Platelet Counts With The Coulter Counter.
Am. J. clin. Path. 44, 678 (1965)

6. COULTER ELECTRONICS, INC.
Instruction And Service Manual for the Model "F"
Coulter Counter
5th edition 4 - 67

7. COULTER ELECTRONICS Limited
Coulter Platelet Kit
(Gebrauchsanweisung)

8. DAVIS, R.E., GREEN, R.E.
Automatic platelet counting with the Coulter particle counter.
J. clin. Path. 20, 777 (1967)

9. DILLARD, G.H.L., BRECHER, G., CRONKITE, E.P.
Separation, Concentration and Transfusion of Platelets.
Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.
78, 796 (1951)

10. EASTHAM, R.D.
Rapid whole-blood platelet counting using an electronic particle counter.
J. clin. Path. 16, 168 (1963)

11. EASTHAM, R.D.
Simple method for separating platelets from red cells before enumeration with an electronic counter.
J. clin. Path. 18, 248 (1965)

12. EGGLETON, M.J., SHARP, A.A.
Platelet Counting using the Coulter electronic counter.
J. clin. Path. 16, 164 (1963)

13. GIRLING, J.H.
An Automatic Platelet counting Technique.
Med.Lab. Technol. 19, 168 (1962)

14. GREBE, D., AUGUSTIN, J., WELLMER, H.-K.
Eine Methode zur Zählung von Thrombozyten im Blut mit einem automatischen Partikelzählgerät.
Blut 19, 202 (1969)

15. HERBINGER, W.
Erfahrungen mit einem elektronischen Blutkörperchen-zählgerät.
Wiener Medizinische Wochenschrift 114, 465 (1964)

16. KUBITSCHEK, E.
Electronic Counting And Sizing Of Bacteria.
Nature 182, 234 (1958)

17. LANCASTRE, F., GINESTE, J., MAUPIN, B.
Numération des hématies, des leucozytes et des plaquettes du sang au moyen d'un compteur électronique de particules.
Nouvelle Revue Francaise D'Hématologie, Tome 5 Nr.3, 521 (1965)

18. MARX, R.
Der Thrombozyt
Band 6 Hämatologie und Bluttransfusion
(Herausgeber W. Stich und G. Rotenstroth-Bauer)
J.F. Lehmann-Verlag, München (1969)

19. MAYNE, E.E., CARVILLE, J.M.
Enumeration of platelets using a model B counter
J. clin. Path. 22, 107 (1969)

20. MAYR, K.
Erfahrungen mit dem Coulterschen Blutkörperchenzählgerät.
Wiener klinische Wochenschrift 77, 702 (1965)

21. O'BRIEN, J.R.
The adhesivisnis of native platelets and its prevention.
J. clin. Path. 14, 140 (1961)

22. PRUDEN, E.L.,WINSTEAD, M.E.
Accuracy Control of Blood Cell counts With The Coulter Counter
Am. J. Med. Techn., Jan-Febr., 1 (1964)

23. ROMEIS, B.
Mikroskopische Technik
16. Auflage
R. Oldenbourg Verlag München-Wien 1968

24. SIPE, C.R. und CRONKITE, E.P.
Studies On The Application Of The Coulter Electronic
Counter In Enumaration Of Platelets.
Annals of the New York Akademy of Sciences, 99, 262 (1962)

25. ZUCKER, M.B., BORELLI, J.
Reversible alterations in platelet morphology produced
by anticoagulants and by cold.
Blood J. Haemat. 9, 602 (1954)

H. KOINZIDENZ KORREKTURKARTE (70µ Kapillare, 0,1 ml Durchflußvolumen

50	51	100	104	150	160	200	216	250	277
51	52	101	105	151	161	201	219	251	279
52	53	102	107	152	162	202	220	252	280
53	54	103	108	153	163	203	221	253	281
54	55	104	109	154	164	204	222	254	282
55	56	105	110	155	166	205	223	255	283
56	57	106	111	156	167	206	224	256	284
57	58	107	112	157	168	207	226	257	286
58	59	108	113	158	169	208	227	258	287
59	61	109	114	159	170	209	228	259	288
60	62	110	115	160	171	210	229	260	289
61	63	111	116	161	172	211	230	261	291
62	64	112	117	162	173	212	232	262	292
63	65	113	119	163	175	213	233	263	293
64	66	114	120	164	176	214	234	264	295
65	67	115	121	165	177	215	235	265	296
66	68	116	122	166	178	216	236	266	297
67	69	117	123	167	179	217	237	267	298
68	70	118	124	168	180	218	239	268	299
69	71	119	125	169	182	219	240	269	301
70	72	120	126	170	183	220	241	270	302
71	73	121	127	171	184	221	242	271	303
72	74	122	129	172	185	222	244	272	304
73	75	123	130	173	186	223	245	273	306
74	76	124	131	174	187	224	246	274	307
75	77	125	132	175	188	225	247	275	308
76	79	126	133	176	190	226	248	276	309
77	80	127	134	177	191	227	250	277	311
78	81	128	135	178	192	228	251	278	312
79	82	129	136	179	193	229	252	279	313
80	83	130	137	180	194	230	253	280	314
81	84	131	139	181	195	231	254	281	315
82	85	132	140	182	196	232	256	282	317
83	86	133	141	183	197	233	257	283	318
84	87	134	142	184	198	234	258	284	319
85	88	135	143	185	199	235	259	285	321
86	89	136	144	186	200	236	260	286	322
87	90	137	145	187	201	237	262	287	323
88	91	138	146	188	202	238	263	288	324
89	92	139	147	189	203	239	264	289	326
90	94	140	149	190	205	240	265	290	327
91	95	141	150	191	206	241	266	291	328
92	96	142	151	192	207	242	268	292	329
93	97	143	152	193	208	243	269	293	331
94	98	144	153	194	209	244	270	294	332
95	99	145	154	195	210	245	271	295	333
96	100	146	155	196	212	246	272	296	334
97	101	147	156	197	213	247	274	297	336
98	102	148	158	198	214	248	275	298	337
99	103	149	159	199	215	249	276	299	338

Beispiele: 1.) Beträgt der vom Gerät angezeigte Wert 5300, so wird 53 aufgesucht und 5400 notiert.

2.) Beträgt der angezeigte Wert 15600, so wird 156 aufgesucht und 16700 notiert.

Herrn Prof.Dr.W. Stich, dem Direktor des Institutes für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM, danke ich für die Möglichkeit, daß ich in seinem Institut meine Doktorarbeit durchführen konnte. Für die weitreichende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bin ich ganz besonders Herrn Dr.M. Schmidt zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Als einziger Sohn des jetzigen Regierungsdirektors Alfons Koschinski und seiner Ehefrau der Ärztin Dr.med.Hedwig Koschinski, geb. Störmer, wurde ich Hans-Jürgen Koschinski, am 31.1.1942 in Königsberg/Pr. geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Wesel/Niederrh. trat ich in das staatliche Gymnasium der gleichen Stadt ein und wechselte in der Obersekunda in das "Heidelberg-College" nach Heidelberg über. Von dieser privaten Internatsschule aus legte ich im März 1963 das Fremdabitur in Weinheim/Bergstr. ab. Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im Sommersemester 1964 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Zahnheilkunde, das ich am 20. Juli 1970 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit September 1970 arbeite ich als zahnärztlicher Assistent in einer Praxis in München.